

Thesis

MUNICH

1964

**Über die Beeinflussung der
L-Aminosäureoxydase-Aktivität von
Rattenlebermitochondrien durch Insulin**

LANE MEDICAL LIBRARY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304

Hubert Weik

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Johs. Brüggemann

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER
L-AMINOSÄUREOXYDASE-AKTIVITÄT
VON RATTENLEBERMITOCHONDRIEN DURCH INSULIN

(Ein Beitrag zur Wirkungsweise synthesefördernder Hormone)

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Hubert Weik

aus

Herrenberg

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

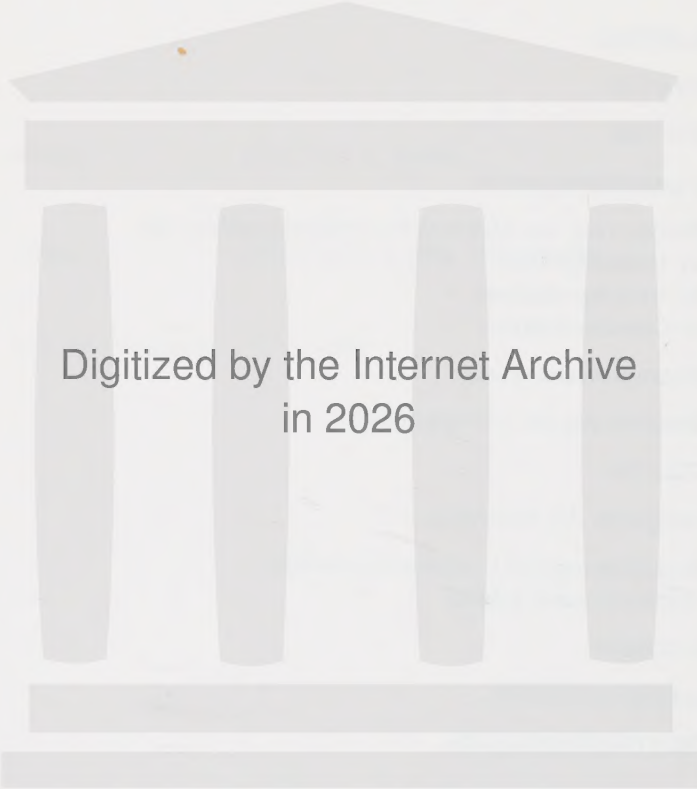
Dekan: Prof. Dr. L. Kotter

Referent: Prof. Dr. Dr. Johs. Brüggemann

Tag der Promotion: 28. 2. 1964

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	3
III. METHODIK	6
1. Versuchstiermaterial	6
2. Bestimmung der Aktivität der l-Aminosäureoxydase	7
a) Thunberg-Test	8
b) Warburg-Methode	10
c) Conway-Methode	12
3. Blutzuckerbestimmung	16
4. Bestimmung des P/O-Quotienten	16
IV. ERGEBNISSE	19
1. Vergleich der Methoden	19
2. Beeinflussung der l-Aminosäureoxydase-Aktivität durch Insulin	20
V. DISKUSSION	31
VI. ZUSAMMENFASSUNG	35
VII. LITERATURVERZEICHNIS	36



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153516_0032

I. EINLEITUNG

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß mitochondriale Flavinenzyme durch synthesefördernde ("anabole") Hormone (1) und durch einige das Wachstum fördernde Antibiotika (Tetracycline, Penicillin) (2) spezifisch gehemmt werden. Gleichzeitig ließen sich Anhaltspunkte dafür gewinnen, daß die charakteristischen Stoffwechselwirkungen, die diesen ganz verschiedenartigen Verbindungen zuzuordnen sind, mit diesem Hemmeffekt in direktem Zusammenhang stehen. Eingehende, in diesem Institut im Jahre 1957 durchgeführte Untersuchungen führten z. B. zu dem Ergebnis, daß die oben genannten synthesefördernden Substanzen im Kaulquappen-Test deutliche antithyreoidale Eigenschaften aufweisen, und zwar wird die Wirkungsentfaltung des Schilddrüsenhormons am Wirkungsort in der Zelle eingeschränkt (3). 1959 ließ sich - ebenfalls in diesem Institut - zeigen, daß die grundumsatzsteigernde Wirkung der Schilddrüsenhormone vermutlich durch Beschleunigung der letzten Stufe der Atmungskette (Cyt. c $\rightarrow$ Cyt. c-Oxydase) zustande kommt (4). Es ist einleuchtend, daß sich eine Thyroxinwirkung in dieser Art nur entfalten kann, wenn alle anderen Enzyme oberhalb dieses beschleunigten Schrittes aktiv genug sind, für den Fall des Kohlenhydratstoffwechsels also alle Enzyme, die zwischen der Glukose und dem Cytochrom c am Zuckerumsatz beteiligt sind. Durch Hemmung der Flavinenzyme, die sich in der Atmungskette oberhalb des Cytochroms c anordnen, würde also ein antithyreoidaler Effekt befriedigend erklärt, weil dann die Wechselzahl dieser Flavinenzyme und nicht mehr die Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation für den Zuckerumsatz begrenzend ist. Auch die antibakterielle Wirkung der Antibiotika dürfte durch Hemmung der Flavinenzyme, insbesondere des phosphorylierenden Enzyms, in den Oxydationszentren bedingt sein, wodurch die Mikroorganismen aus Energiemangel (Ausfall der oxydativen Phosphorylierung) ihre Teilungsfähigkeit einbüßen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die oxydative Phosphorylierung von Lebermitochondrien in vivo durch Thyroxin entkoppelt (1). Die Phosphorylierungsstörung ließ sich durch das "anabole" Hormon Insulin in kurzer Zeit normalisieren; Chlortetracyclin wirkt in prinzipiell gleicher Weise. Das Ansteigen der Phosphorylierungsrate stand offensichtlich in engem Zusammenhang mit der Hemmung eines Flavinenzyms, der DPN-H-Cytochrom c-Reduktase. Zahlreiche, von verschiedenen Arbeitskreisen in den letzten Jahren angestellte Versuche hatten schon ergeben, daß der Elektronentransport vom

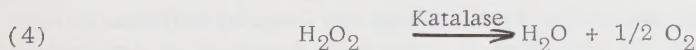
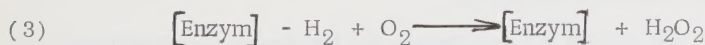
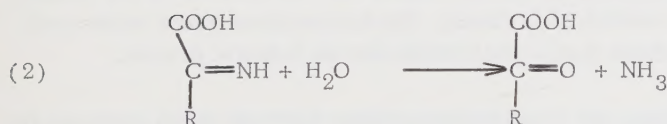
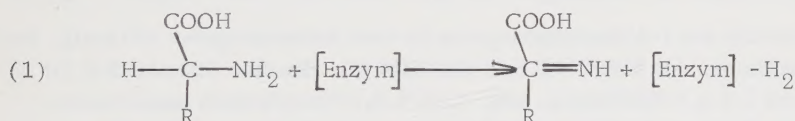
DPN-H zum Cytochrom c über die genannte Reduktase - im Gegensatz zur Phosphorylierungskette - ohne ATP-Bildung vor sich geht. Bei steigendem Angebot an exogenem Thyroxin scheint die DPN-H-Oxydation zunehmend auf diesem Weg zu erfolgen, was zu einem Absinken der Phosphorylierungsquote führt. Durch Hemmung der Cyt. c-Reduktase läßt sich der Elektronentransport über die Phosphorylierungskette umleiten (vergl. hierzu Abbildung 7, Seite 28). Auch in diesem Falle kommt es also durch Hemmung eines Flavinenzyms zu einem echten antithyreoidalen Effekt.

Wir wissen heute, daß es bei einem Überwiegen der Thyroxin- bzw. Nebennierenrinden-(NNR-)hormonwirksamkeit im intermediären Stoffwechsel zu einer gesteigerten Oxydation von Aminosäuren kommt ("Eiweißkatabolismus"). Nun handelt es sich bei der l-Aminosäureoxydase der Säugetiergewebe ebenfalls um ein Flavinenzym, das für die Oxydation zahlreicher, insbesondere essentieller Aminosäuren verantwortlich zu machen ist. Es dürfte daher von Interesse sein, der Frage nachzugehen, ob "anabole" Hormone die Oxydation der l-Aminosäuren durch Hemmung dieses Flavinenzyms einschränken. Für die genannten Antibiotika (Tetracycline und Penicillin) konnte in dieser Hinsicht bereits eine positive Antwort erhalten werden (2). Mir wurde deshalb die Aufgabe übertragen, die Beeinflussung der l-Aminosäureoxydase-Aktivität durch Insulin näher zu untersuchen.

II. LITERATUR

Zum Abbau der Aminosäuren werden von der Zelle im wesentlichen drei Wege beschritten: Die Decarboxylierung zu den entsprechenden Aminen, die Transaminierung und die oxydative Desaminierung. Die oxydative Desaminierung wird durch die Aminosäureoxydasen katalysiert. Entsprechend der d- und l-Konfiguration der Aminosäuren kennt man eine d- und eine l-Aminosäureoxydase, die beide in den Zellmitochondrien lokalisiert sind. Beide Enzyme konnten als Flavinenzyme identifiziert werden.

Bei der oxydativen Desaminierung werden die folgenden Reaktionsschritte durchlaufen: Zuerst wird die Aminosäure zur unbeständigen Iminosäure dehydriert. Der Wasserstoff wird vom Flavin-Co-Ferment der Aminosäureoxydase übernommen. Dieser Schritt konnte von FRIEDEN und VELICK (5) mit Hilfe von schwerem Wasser bewiesen werden. Aus der Iminosäure entsteht dann spontan - also nicht enzymatisch - die entsprechende Ketosäure und Ammoniak. Das hydrierte Enzym reagiert mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffsperoxyd, das sofort katalatisch zersetzt wird:



Von den l-Aminosäureoxydasen, die bei den verschiedensten Organismen nachgewiesen wurden, ist das in der Rattenniere vorkommende Enzym am eingehendsten untersucht worden. Es konnte von BLANCHARD u. Mitarb. (6) bis zu einem elektrophoretisch einheitlichen Produkt angereichert werden. Co-Ferment ist Flavinmononukleotid (FMN), und zwar kommen 2 Mo! FMN auf

1 Mol Enzym. Die gefundene Wechselzahl, nach der nur 5 Moleküle 1-Aminosäure pro Mol Enzym und Minute umgesetzt werden, ist gegenüber dem entsprechenden Wert von 1440 für die d-Aminosäureoxydase unwahrscheinlich gering. In vivo ist der Unterschied wesentlich geringer, so daß anzunehmen ist, daß bei der Anreicherung eine beträchtliche Inaktivierung des Enzyms stattgefunden hat. Das Ferment oxydiert 14 verschiedene 1-Aminosäuren, davon Leucin, Methionin, Iso-Leucin, Phenylalanin, Tryptophan und Valin als essentielle Aminosäuren. Besonders interessant ist der Befund, daß das Enzym die Aminosäuren, die durch spezielle Fermente oder durch Transaminasen oxydiert werden (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll) praktisch nicht angreift. Damit scheint es für die Oxydation essentieller Aminosäuren von besonderer Bedeutung zu sein.

BOULANGER und Mitarb. (7) reicherten die 1-Aminosäureoxydase aus Truthahnleber an und prüften die Wirksamkeit des Enzyms mit d, l-Ornithin bzw. d, l-Lysin. Beide Aminosäuren wurden mit schwerem Stickstoff markiert. Mit dieser Versuchsanordnung konnte nachgewiesen werden, daß selektiv die α -Aminogruppe der l-Form desaminiert wird. Das Ferment setzt also spezifisch l- α -Aminogruppen um.

Die Aktivität der 1-Aminosäureoxydase ist vom Substratangebot abhängig. Nach Untersuchungen von SHEFFNER und BERGEIM (8), die eine Standarddiät für 14 Tage mit 3 % d, l-Methionin, bzw. 3,85 % d, l-Phenylalanin anreicherten, steigt die Fermentaktivität in der Rattenniere um 56, bzw. 62 %; die verwendete Standarddiät enthielt 15 % Casein. Die Aminosäureoxydase wurde nach der WARBURG-Methode (s. u.) mit l-Methionin als Substrat getestet.

Über die Beeinflussung der 1-Aminosäureoxydase-Aktivität durch Hormone liegen bisher kaum Untersuchungen vor.

CAGAN, GRAY und JENSEN (9) erweiterten die Ergebnisse von SHEFFNER und BERGEIM (8). Bei parenteraler Verabreichung von Caseinhydrolysaten an normale Ratten fanden sie schon nach 30 Minuten ein Ansteigen der Aminosäureoxydaseaktivität in der Leber um 50 % und in der Niere um 89 %. Entsprechende adrenal- bzw. hypophysektomierte Tiere hatten eine wesentlich geringere Ausgangsaktivität, die durch zusätzliche Aminosäurezufuhr nicht erhöht werden konnte. Andererseits steigerte ein NNR-Extrakt die Fermentaktivität in der Leber normaler und nebennierenloser Tiere in vivo und in vitro um 100 %. Insulin (0,5 E/Tier/Std.) verminderte dagegen die Aktivität um ca. 30 %.

Leider sind diese Ergebnisse von CAGAN u. a. (9) bezüglich der l-Aminosäureoxydase von nur begrenzter Gültigkeit, weil die Autoren bei der Bestimmung der Fermentaktivität (WARBURG-Methode) d. l-Alanin als Substrat verwendet haben, so daß die d-Aminosäureoxydase miterfaßt wurde. Außerdem kann bei dieser Versuchsanordnung eine Alaninoxydation über Transaminasen nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem kann man aus diesen Versuchen entnehmen, daß die Aminosäureoxydasen höchstwahrscheinlich durch die NNR aktiviert und durch Insulin gehemmt werden, zumal ältere Arbeiten in dieselbe Richtung weisen. So fanden BACH und HOLMES (10) schon 1937, daß im Leberhomogenat die Harnstoffbildung durch Insulin infolge einer herabgesetzten Desaminierung verringert wird. Ferner nahm die Harnstoffbildung in Gegenwart von Alanin zu, was durch Insulin verhindert werden konnte. Auch STADIE und Mitarb. (11) fanden, daß Insulin in der isolierten Leber die Desaminierung von d-Aminosäuren hemmt; die Oxydation der l-Isomeren wurde allerdings in diesen Versuchen nicht signifikant vermindert.

Aus dieser kurzen Literaturübersicht ist zu ersehen, daß keine eindeutigen experimentellen Ergebnisse über die Beeinflussung der l-Aminosäureoxydase durch Insulin vorliegen. Daher soll diese Frage im Folgenden näher untersucht werden.

III. METHODIK

1. Versuchstiermaterial

Als Versuchstiere dienten Sprague-Dawley-Ratten männlichen Geschlechts. Die Tiere wurden entsprechend der Diät, die sie erhielten, zu zwei Hauptgruppen zusammengefaßt.

Gruppe A erhielt eine institutseigene Diät ("Zuchtfutter grün") mit folgender Zusammensetzung (in Teilen):

45 Weizenschrot	⁺ Mineralstoffmischung:
30 Maisschrot	40 % Kohlensäurer Futterkalk
15 Sojaschrot	30 % phosphorsaurer Futterkalk
3 Magermilchpulver	24,5 % Viehsalz
2 Luzernegrünmehl	5 % Magnesiumsulfat
2 Mineralstoffmischung ⁺	0,5 % Spurenelemente als Sulfate
	(Fe:Cu:Mn:Co = 5:1,5:1:0,2)

Gruppe B erhielt "Altromin"-Fertigfutter, Fa. Altrogge, Lage/Lippe, mit der folgenden Zusammensetzung:

Grundzusammensetzung:

48 % Gerste
18 % Hafer (geschält)
12 % Mais
17 % Eiweißkonzentrat, bestehend aus
40 % Fischvollmehl (65 % Rohprotein)
37 % Tierkörpermehl (65 % Rohprotein)
16 % Waldhof-Trockenfutterhefe
7 % Futterknochenschrot (unentleimt)
4 % Luzernegrünmehl
1 % Dicalciumphosphat (mit Vitaminen und Spurenelementen)

Altromin

Wirkstoffgehalt pro kg	10 000 I.E. Vit. A	
Fertigfutter:	25 mg Vit. E	
	1 000 I.E. Vit. D ₃	
Magnesium	370 mg	
Eisen	33 mg	
Kupfer	15 mg	
Mangan	10 mg	als Sulfate
Zink	10 mg	
Kobalt	0,05 mg	

Aus Gruppe A und B wurden für die einzelnen Versuche jeweils Tiere gleicher Wachstumsintensität verglichen.

2. Bestimmung der Aktivität der l-Aminosäureoxydase

Für die Messung der l-Aminosäureoxydase stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die leider alle eine vollkommene Spezifität vermissen lassen. Hierfür sind insbesondere zwei Ursachen verantwortlich zu machen: An erster Stelle stören die Überlagerungen mit anderen Fermentreaktionen, die in gewissem Umfang bei allen Fermentaktivitätsmessungen in Gewebehomogenaten oder Mitochondriensuspensionen auftreten. Zum Beispiel kann durch Transaminierung von Aminogruppen auf α -Ketoglutarinsäure Glutaminsäure entstehen, die dann sekundär durch eine spezifische Glutaminsäure-Dehydrogenase desaminiert wird. Man muß demnach als Substrat eine Aminosäure verwenden, die möglichst wenig an Transaminierungsreaktionen teilnimmt. Asparaginsäure und Glutaminsäure kommen nicht in Frage. Am besten haben sich l-Leucin, unter besonderen Bedingungen auch l-Alanin, bewährt. Eine Transaminierung der Aminogruppe des Alanins scheint bei der verhältnismäßig niedrigen, endogenen Ketoglutaratkonzentration nur in geringem Umfang möglich zu sein.

An zweiter Stelle ist zu bedenken, daß in derartigen Homogenaten durch Proteolyse kontinuierlich freie Aminosäuren entstehen, die einen hohen Blindwert liefern, der aber in diesem Falle nicht als Blindwert bezeichnet werden kann, da er ja zu einem großen Teil durch die zu untersuchende Fermentreaktion - Oxydation von l-Aminosäuren durch Aminosäureoxydase - entsteht. Durch Zusatz von "Extra-Substrat" erfaßt man also nur einen Teil der wahren Ferment-

aktivität. Dieser Mangel läßt sich wenigstens teilweise dadurch korrigieren, daß man nur gut ausgewaschene Mitochondrien bzw. Sarkosomen-Suspensionen zum Test heranzieht.

Speziell ist die Bestimmung der L-Aminosäureoxydase auf drei verschiedenen Wegen möglich: Da es sich um ein Flavinenzym handelt, kann die Fermentreaktion leicht anhand der Formazan-Bildung aus Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Gegenwart von Methylenblau verfolgt werden (Thunberg-Test). Außerdem wird bei der Fermentreaktion Sauerstoff verbraucht und Ammoniak gebildet, so daß diese Kriterien ebenfalls für die Aktivitätsmessung herangezogen werden können.

a) Thunberg-Test

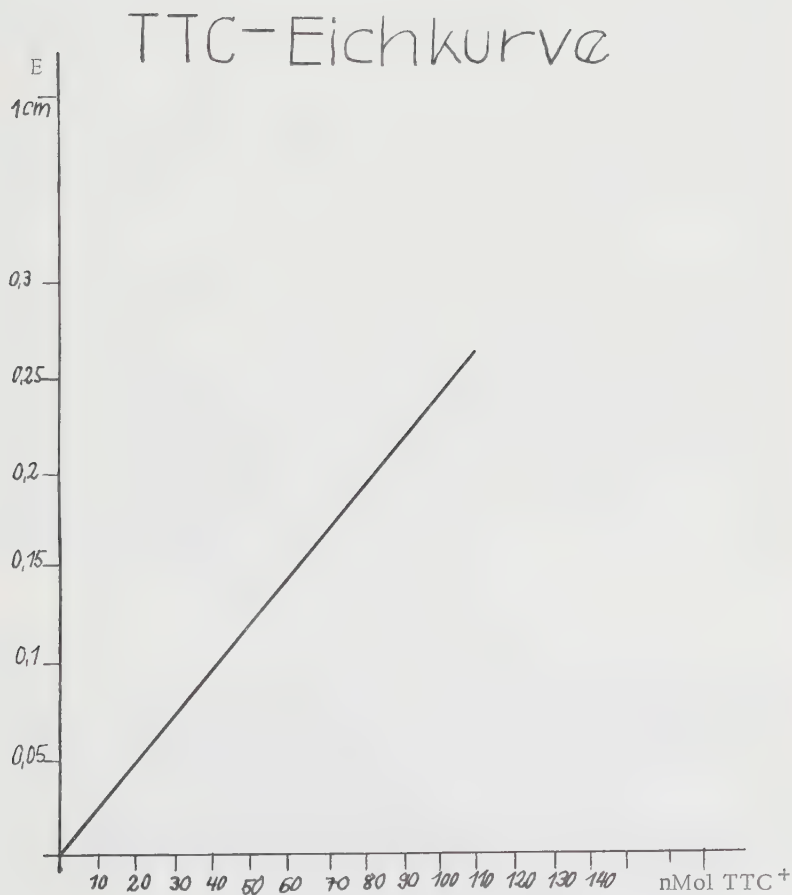
Bei diesem Verfahren ist zusätzlich zu den oben genannten Mängeln zu bedenken, daß alle Flavinenzyme erfaßt werden. Endogene Substrate, die entweder noch im Homogenat bzw. in den Mitochondrien enthalten sind oder durch den kontinuierlich stattfindenden Abbau von Eiweiß und Lipoiden entstehen, bilden ebenfalls Formazan. Allerdings ist diese Methode einfach zu handhaben. Folgender Ansatz wurde in ein 10 ml-Zentrifugenglas pipettiert:

- 0,04 ml Methylenblau 0,2%ig
- 0,12 ml TTC-Lösung 1%ig
- 0,16 ml Tris-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan
0,05 m + 0,1 n HCl auf p_H 7,2 eingestellt)
- 0,1 ml l-Leucin-Lösung (bzw. 0,1 ml Wasser=Kontrollprobe)
- 0,1 ml Mitochondriensuspension

Sofort anschließend wurde zur Entfernung des Luftsauerstoffs genau 1 Minute O_2 -freier Stickstoff eingeleitet, das Glas mit einem Stopfen verschlossen und eine Stunde bei $37^\circ C$ in einem Thermostaten gehalten. Dann wurde die Reaktion durch einen Tropfen n HCl unterbrochen und das gebildete Formazan nach Zugabe von 1,5 ml Aceton und 4,5 ml TCC^+ aus der wässrigen Phase extrahiert. Die wässrige Schicht wurde abgetrennt und das Formazan gegen Wasser kolorimetriert (Filter: Hg 492 nm). Ausgewertet wurde nur die durch das zugesetzte "Extra-Substrat" umgesetzte TTC-Menge (=Formazanbildung + Leucin minus Formazanbildung ohne "Extra-Leucin"). Die Fehlergrenze ergab

$^+$ Tetrachlorkohlenstoff

Abbildung 1



⁺ nMol = Nano-Mol = 10^{-9} Mol

sich aus 10 Parallelbestimmungen zu $\pm 16\%$. Die Streuung ist durch die oben angeführten Mängel des Verfahrens bedingt. Als Bezugswert wählten wir für alle Methoden Kjeldahl-N $\times 6,25$. Abbildung 1, S. 9, zeigt die Eichkurve.

Gewinnung der Mitochondrien (12)

Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet. Von der sofort herauspräparierten Leber wurden ungefähr 5 g abgewogen und in eiskalter 0,25 m Saccharoselösung gewaschen.

Bei allen folgenden Arbeitsgängen wurden eisgekühlte Lösungen und vorgekühlte Zentrifugengläser, bzw. eine Kältezentrifuge benutzt, um die Enzymaktivität für die später erfolgende Messung möglichst zu erhalten.

Die gewaschene Leber wurde mit etwa 12 ml einer 0,25 m Saccharoselösung, die 200 mg Titriplex III/100 ml enthielt, im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Rohrzucker-Titriplexlösung auf 50 ml aufgefüllt und bei 2500 U/Min. bei $2 - 4^{\circ}\text{C}$ 10 Min. lang zentrifugiert. Aus der überstehenden Flüssigkeit setzten sich die Mitochondrien in einer hoch-tourigen Kältezentrifuge bei 18500 U/Min. (ca. 20 000 g) in 15 Minuten ab. Der Überstand wurde abdekantiert und die Mitochondrien in 12 ml Rohrzucker-Titriplexlösung suspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 15 000 U/Min. (2°C) über eine Dauer von 5 Min. wurde die überstehende Waschflüssigkeit wiederum verworfen und die Mitochondrien in 5 ml reiner Saccharoselösung suspendiert.

b) Warburg-Methode

Die zweite Möglichkeit, nämlich aus dem Sauerstoffverbrauch auf die Desaminierungsgeschwindigkeit zu schließen, weist ähnliche Fehlermöglichkeiten auf wie der Thunberg-Test: Hoher Blindwert durch die verschiedensten endogenen Substrate. Trotzdem wurde dieses Verfahren bisher am häufigsten zur Bestimmung der L-Aminosäureoxydaseaktivität herangezogen. Als Substrat wurde L-Metionin oder auch L-Alanin bevorzugt verwendet. Wir haben für dieses Verfahren den folgenden Ansatz gewählt:

- 0,15 ml KCN-Lösung (6,5 mg/ml in Tris-Puffer p_{H} 7,2)
- 0,5 ml l-Leucin-Lösung (2,76 mg/ml in Tris-Puffer p_{H} 7,2)
- 0,2 ml Tris-Puffer p_{H} 7,2
- 0,5 ml Mitochondriensuspension

Die Messung des O_2 -Verbrauches erfolgte in kleinen Warburg-Kölbchen ($V = 5 \text{ ml}$). Die Leucin-Lösung wurde in die Ansatzbirne pipettiert. Der innere Einsatz enthielt 0.2 ml einer 30% igen KOH und ein kleines Filtrierpapierfähnchen zur Absorption des entstehenden CO_2 , der Gasraum Luft.

Nach dem Füllen wurden die Gefäße auf Manometer aufgesetzt, in den auf 37° temperierten Thermostaten gebracht und zum Temperatenausgleich 10 Minuten bei geöffnetem System geschüttelt. Als Thermostat wurde die Warburgapparatur Modell "V" von B. Braun, Melsungen, verwendet. Zur Berücksichtigung von Temperaturschwankungen des Thermostaten und Änderungen des Außendruckes wurden bei jedem Versuch 2 Nullmanometer angesetzt, die in gleicher Weise beschickt, aber frei von Mitochondrien waren. Als Manometerflüssigkeit diente Brodie-Lösung, deren spez. Gewicht bei 20° C 1.034 beträgt. 10^4 mm Brodie-Lösung entsprechen demnach 760 Torr . Die Schüttelfrequenz betrug bei allen Versuchen 80 Schwingungen pro Minute.

Jeder Versuch lief über 60 Minuten. Das Leucin wurde nach dem Temperaturausgleich und dem Schließen der Manometer in die Untersuchungslösung eingekippt. Da die Fehlergrenze in den ersten 10 Minuten besonders groß ist, die Reaktion andererseits in den letzten 10 Minuten z. T. nicht mehr ganz linear verläuft, wurde das Intervall zwischen der 10. und der 50. Minute ausgewertet. Die folgenden Daten wurden registriert:

1. Die Zeit (T)
2. Die Druckänderung (P_1)
3. Die Druckänderung im Nullmanometer (P_2)

Mit Hilfe dieser 3 Größen, dem bekannten Gefäßvolumen (V) und dem ebenfalls bekannten Volumen der eingesetzten Flüssigkeit läßt sich der O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3 O_2$ berechnen. Auf Normalbedingungen reduziert ergibt sich folgende Formel:

$$X_{O_2} = (P_1 \cdot K_{1O_2}) - (P_2 \cdot K_{2O_2})$$

X ist die verbrauchte O_2 -Menge, P_1 die Druckänderung im Versuchsmanometer, P_2 die Druckänderung im Nullmanometer und K_{1O_2} und K_{2O_2} die zugehörigen Gefäßkonstanten für Sauerstoff, die durch folgende Formel definiert sind:

$$K_{O_2} = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + (V_F \cdot \alpha)}{P_{\text{norm.}}}$$

V_G = Volumen des Gasraumes

V_F = Volumen der Flüssigkeit

T = absolute Temperatur

$P_{\text{norm.}}$ = Normaldruck (= 10 000 mm Brodielösung)

$\mathcal{L}$ = Bunsenscher Absorptionskoeffizient

Da in dem verwendeten Trispuffer nur sehr wenig O_2 gelöst wird, ist der Ausdruck $V_F \cdot \mathcal{L}$ bei der Auswertung der Ergebnisse vernachlässigt worden.

Zur Ermittlung der Fehlergrenze des Verfahrens wurden 6 Normalansätze (6 Hauptwerte und 6 Blindwerte ohne Substrat) ausgewertet. Der mittlere Fehler des Einzelwertes errechnet sich zu $\pm 20\%$. Diese verhältnismäßig große Streuung ist durch den hohen Blindwert bedingt.

c) Conway-Methode

Die dritte Möglichkeit zur Bestimmung der l-Aminosäureoxydaseaktivität besteht in der Erfassung des Ammoniaks, das bei der Desaminierung freigesetzt wird. Auch in diesem Falle ist mit Störungen durch endogenes Substrat und durch Transaminierungsreaktionen zu rechnen; die "Extra- NH_3 "-Bildung ist aber spezifisch für den Aminosäureumsatz. Bei mehrmals gewaschenen Lebermitochondrien haben wir mit diesem Verfahren gute Ergebnisse erhalten. Außerdem ist diese Methode sehr empfindlich, weil mit Hilfe des Neßlerschen Reagens schon kleinste NH_3 -Mengen quantitativ erfaßt werden können.

In die kleinen Warburgkölbchen (s. o.) wurde der folgende Ansatz pipettiert:

Hauptraum: 0.5 ml Tris-Puffer p_H 7.2
0.5 ml Mitochondriensuspension
0.5 ml Leucin-, bzw. Alanin-Lösung
(2.76, bzw. 1.8 mg/ml)

Seitenarm: 0.1 ml Trichloressigsäure 10%ig

Für jede Messung setzten wir 3 Parallelproben und entsprechend 3 Blindwerte ohne Substrat an.

Die Kölbchen wurden im Warburg-Thermostaten bei 37° C 60 Min. lang geschüttelt. Danach wurde die Reaktion durch Einkippen der Trichloressigsäure in den Hauptraum abgebrochen.

Die Ammoniakbestimmung erfolgte nach Conway: Mit Hilfe einer gesättigten Kaliumkarbonatlösung wird das Ammoniak aus der mit Trichloressigsäure versetzten Inkubationslösung ausgetrieben und diffundiert in eine Borsäurelösung.

Ansatz im Conway-Gefäß:

- | | |
|---------------|--|
| innerer Teil: | 2 ml Borsäurereagenz ⁺ |
| äußerer Ring: | 1.5 ml Inkubationslösung + 0.1 ml Trichloressigsäure, die mit Aqua dest. quantitativ aus dem Warburgkölbchen in das Conway-Gefäß gespült wurden. |
| | 1.5 ml gesättigte K ₂ CO ₃ -Lösung |

Das gasdicht verschlossene Conway-Gefäß blieb ca. 16 Std. stehen. Dann wurde das Borsäurereagenz mit dem darin enthaltenen Ammoniak in ein 10 ml-Meßkölbchen übergeführt und das Kölbchen bis zur Marke mit Aqua dest. aufgefüllt. Dazu wurde 0.5 ml Neßlers Reagenz gegeben und die auftretende gelbbraune Farbe nach 3 Min. im Eppendorf-Gerät gemessen (436 nm; d = 1 cm). Eichkurve Abb. 2, Seite 14.

Die Ammoniakmenge wurde auf mg Protein bezogen (Proteinbestimmung über Kjeldahl-N x 6.25).

Die Fehlergrenze dieses Verfahrens ergab sich aus 6 Parallelmessungen (6 Hauptwerte + 6 Blindwerte) zu $\pm 4\%$, so daß diese Methode - verglichen mit dem Warburg- und Thunberg-Test - die kleinste Streubreite aufweist.

⁺ Borsäurereagenz: 5 g Borsäure + 200 ml absol. Alkohol + 10 ml Indikatorlösung (0.033 % Bromkresolgrün und 0.066 % Methylrot in absol. Alkohol) + Alkali bis zu schwach rötlichem Farbton + H₂O ad 1 000 ml.

Abbildung 2

Stickstoff-Eichkurve

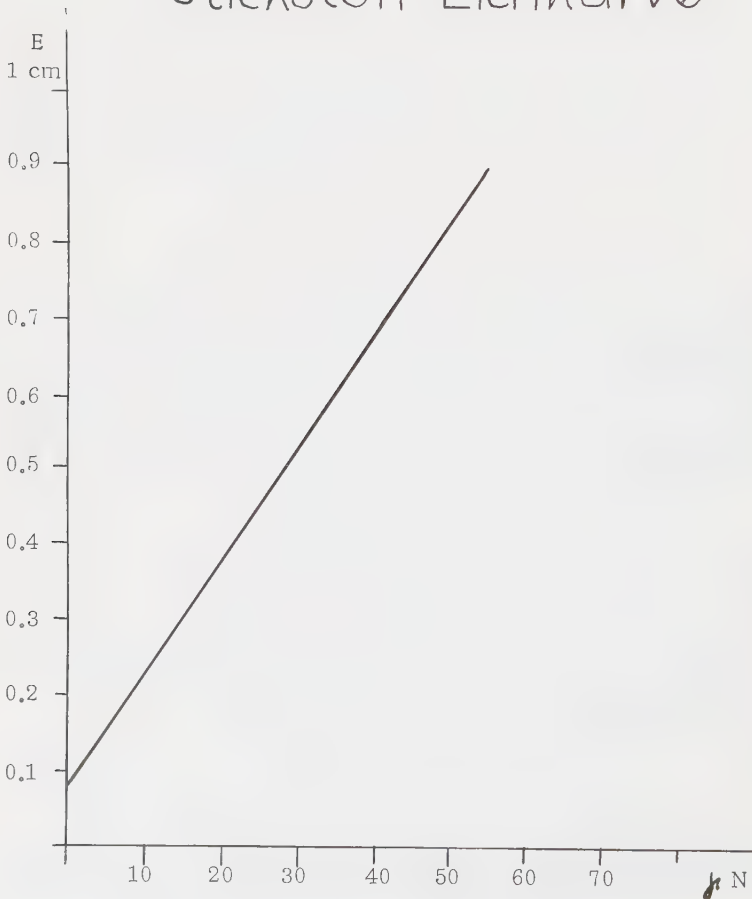
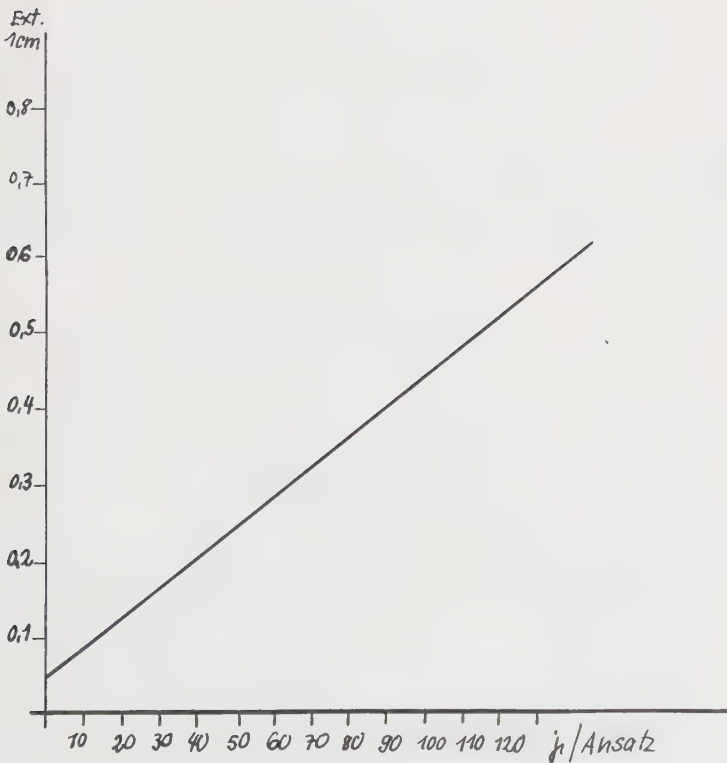


Abbildung 3

Glukose-Eichkurve



3. Blutzuckerbestimmung

Zur Blutzuckerbestimmung verwendeten wir die Anthronmethode. Das Blut wurde beim frisch getöteten Tier nach Eröffnen des Thorax durch Herzpunktion gewonnen. 0,1 ml Blut wurden in einer Lösung von 5 ml ZnSO_4 (0,45%) + 1 ml 0,1 n NaOH 3 Min. gekocht, anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt und filtriert. Das Filtrat wurde im Meßzylinder auf 6 ml aufgefüllt. Davon wurden 2 ml entnommen und mit 3 ml Anthronlösung (100 mg Anthron in 54 ml konzentrierter Schwefelsäure gelöst) gemischt. Die auftretende Färbung ist dem Glukosegehalt direkt proportional. Sie wurde im Eppendorfgerät bei 578 nm und $d = 1$ cm gegen H_2O gemessen (Eichkurve Abb. 3, Seite 15).

4. Bestimmung des P/O-Quotienten (nach (12))

Der bei der Atmung verbrauchte Sauerstoff wurde in der Warburgapparatur gemessen (s. o.).

Zur Durchführung des Versuches wurden folgende Mengen in die Warburgkölbchen einpipettiert:

Hauptraum:	0,7 ml Stammlösung ⁺ 0,2 ml Mitochondriensuspension
mittlerer Einsatz:	0,2 ml 2,5 n NaOH
Seitenarm:	0,3 ml DPN-Nikotinsäureamid- Hexokinase-Mischung ⁺⁺

⁺Zusammensetzung der Stammlösung für den Hauptraum:

je 1,0 ml	MgCl_2	0,0925 m
	KCl	0,33 m
	NaF	0,24 m
	β-Oxybuttersäure	0,15 m
	ATP- Na_4	0,0077 m
	PO_4^{---}	0,385 m (p_{H} 7,4)
	Cytochrom-c	$1,5 \cdot 10^{-4}$ m
	Glukose	0,4 m
	Wasser	

⁺⁺Zusammensetzung der Lösung für den Seitenarm:

3,0 ml	DPN ⁺	0,001 m
120 mg	Nikotinsäureamid	
15 mg	Hexokinase	

Die Warburggefäße wurden zum Temperatenausgleich 7 Min. lang bei 30° C mit geöffneten Hähnen geschüttelt. Dann wurden die Hähne geschlossen, die Lösung aus dem Seitenarm in den Hauptraum gekippt und sofort der Null-Minuten-Wert am Manometer abgelesen. Die Inkubationsdauer betrug 25 Min., wobei alle 5 Min. der Manometerwert festgestellt wurde. Anschließend wurde die Reaktion mit 0.4 ml 20 % Trichloressigsäure abgebrochen und die Gefäße in Eis gestellt.

Der Blindwert Bl_1 wurde ohne Inkubation bestimmt. Gleich zu Anfang wurde die Stammlösung mit 0.4 ml 20 % Trichloressigsäure versetzt, damit keine Fermentreaktion stattfinden konnte; im übrigen unterschied sich der Ansatz nicht von dem des Hauptwertes.

Mit Hilfe des Blindwertes Bl_2 wurde die Leerratmung und die ATPase-Aktivität erfaßt. Dieser Blindwert unterschied sich vom Hauptwert lediglich dadurch, daß die Stammlösung keine β -Oxybuttersäure enthielt.

Phosphatbestimmung: Das Eiweiß, das durch die Trichloressigsäure ausgefällt worden war, wurde anschließend abzentrifugiert und der klare Überstand in einen 100 ml-Meßkolben übergeführt. Der Kolben wurde bis zur Marke aufgefüllt und zu 3 ml seines Inhalts nacheinander

5 ml Isobutanol-Benzol (1:1)

0.5 ml 10 n H_2SO_4

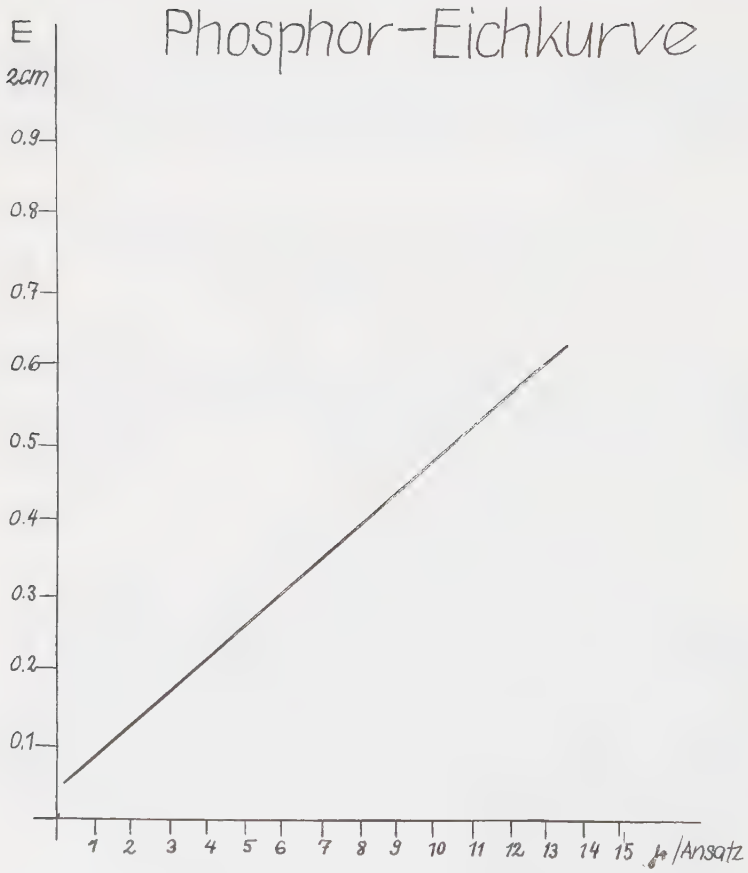
0.5 ml 10%ige Ammoniummolybdatlösung

zugesetzt. Anschließend wurde der Phosphormolybdänsäurekomplex durch kräftiges Schütteln in die Isobutanol-Benzolphase übergeführt. Davon wurden 2 ml mit 4 ml eines Schwefelsäure-Alkohol-Gemisches (32 ml konz. H_2SO_4 gelöst in 968 ml absolutem Alkohol) kräftig durchgeschüttelt und mit 0.5 ml einer 200 fach verdünnten $SnCl_2$ -Lösung (10 g $SnCl_2 \cdot 10 H_2O$ gelöst in 25 ml konz. HCl) versetzt. Die Intensität der auftretenden Blaufärbung wurde im Eppendorfgerät gemessen (578 nm; d = 2 cm).

(Eichkurve Abb. 4, Seite 18)

Die μg Atome Sauerstoff, bzw. Phosphat, die während der Reaktionszeit verbraucht worden waren, wurden auf mg Protein bezogen und daraus der P/O-Quotient errechnet.

Abbildung 4



IV. ERGEBNISSE

1. Vergleich der zur Verfügung stehenden Methoden

In einer ersten Versuchsreihe waren die verschiedenen Methoden, die zur Bestimmung der l-Aminosäureoxydase-Aktivität verwendet werden können, miteinander zu vergleichen. Ratten der Auswahl A ("Zuchtfutter grün", gleiche Wachstumsgeschwindigkeit, etwa 250 g KG), denen über Nacht das Futter entzogen worden war, wurden entweder mit 10 E Insulin (Insulin "Hoechst", bzw. Kristall-Insulin "Novo") oder mit einem entsprechenden Volumen physiologischer NaCl-Lösung s.c. gespritzt und 30 Minuten später getötet. Die aus der Leber gewonnenen Mitochondrien wurden nach den beschriebenen Verfahren auf ihre l-Aminosäureoxydase-Aktivität untersucht (Substrat = l-Alanin). Das Ergebnis ist in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Bestimmung der l-Aminosäureoxydase nach der
Thunberg-, Warburg- und Conwaymethode
(Lebermitochondrien, Substrat l-Alanin)

0.25 ml s. c. 30' vor der Tötung	THUNBERG nMol ⁺ TTC/mg Prot./Stunde	WARBURG mm ³ O ₂ /mg Prot./Stunde	CONWAY μN/100 mg Prot./Stunde
NaCl	9.5	1.92	13.1
NaCl	11.4	1.00	11.0
NaCl	14.1	1.81	16.4
NaCl	18.7	1.46	14.8
Insulin (=10 E)	u. d. N. ⁺⁺	u. d. N.	u. d. N.

⁺ nMol = Nano-Mol = 10⁻⁹ Mol

⁺⁺ u. d. N. = unter der Nachweisgrenze

Man findet also in den Lebermitochondrien dieser Tiere mit allen drei Verfahren eine meßbare Desaminierung, die 30 Min. nach 10 E Insulin unter die Nachweisgrenze absinkt. Demnach scheinen alle drei Methoden prinzipiell übereinstimmende Ergebnisse zu liefern.

2. Beeinflussung der l-Aminosäureoxydase-Aktivität durch Insulin

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Hemmung der l-Aminosäureoxydation näher untersucht. Auch in diesem Fall wurden Ratten der Auswahl A von gleicher Wachstumsintensität verwendet. Die Tiere waren ebenfalls über Nacht ausgenüchtert, entsprechend mit Insulin (10 E) oder physiologischer NaCl-Lösung gespritzt und zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion getötet worden. Die Höhe des Blutzuckerspiegels wurde parallel verfolgt.

Mit Hilfe der Warburg-Methode untersuchten wir zuerst, in welcher Zeit nach der Insulin-Injektion eine Hemmung der Desaminierung in der Leber auftritt (Substrat l-Alanin). Andererseits wurde bei alloxandiabetischen Ratten geprüft, ob die Fermentaktivität im Diabetes erhöht ist. Die diabetischen Tiere erhielten wir durch Injektion von 40 mg Alloxan/kg KG, nach 48-stündiger Nahrungskarenz. Wenn das Insulin inhibiert, sollte man bei Abwesenheit des Hormons ein entsprechendes Ansteigen der Fermentaktivität erwarten. In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt.

Tabelle 2

l-Aminosäureoxydase-Aktivität bei Diabetes und nach Insulininjektion
(Warburg-Methode, Substrat l-Alanin;
Angabe des O₂-Verbrauchs in mm O₂/mg Prot./Std.)

KONTROLLE O ₂ -Verbrauch	DIABETES				KONTR. + INSULIN	
	Monate nach Alloxan	O ₂ -Ver- brauch	Nüchtern- BZ mg%	Tier- zahl	Min. nach Insulin	O ₂ - Verbrauch
1,5 ± 0,41	1 1/2	3,7-6,0 Ø 5,1	385	5		
	5 1/2	1,8-2,8 Ø 2,4	225	4	15	u. d. N.
	6	2,1	180	1	30	u. d. N.
	9	0,5-1,6 Ø 1,3	131	4		

Aus den Daten der Tabelle 2 geht hervor, daß schon 15 Minuten nach s. c. -Gabe von 10 E Insulin die Desaminierungsgeschwindigkeit der Leber auf unmeßbar kleine Werte zurückgeht. Im Alloxan-Diabetes erreicht die Aktivität 4 - 6 Wochen nach der Alloxangabe ein Maximum (Anstieg auf das drei- vierfache der Normalaktivität), um mit der Zeit - parallel mit dem Nüchternblutzucker - wieder abzufallen. In früheren, auch in diesem Institut durchgeführten Versuchen wurde eine ähnliche Kurve für die Mitochondrienzahl der diabetischen Leber und entsprechend für die Bernsteinsäuredehydrase-Aktivität gefunden (13), so daß sich diese, hinsichtlich der Aminosäureoxydase erhaltenen Ergebnisse in die früher erhobenen Befunde organisch einordnen (Abb. 5, Seite 22).

Anschließend sollte der gefundene Insulineffekt mit der Conway-Methode reproduziert werden. Die Versuchsanstellung entsprach der oben beschriebenen. Das Ergebnis kann aus der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3

Hemmung der l-Aminosäureoxydase durch Insulin
(Conway-Methode; Substrat l-Alanin)

Minuten nach 10 E Insulin getötet	BZ ⁺ mg%	Abnahme %	µN/100 mg Prot. /Stunde	Abnahme %	Tier- zahl
0	91	-	14.0	-	6
5	65	29	3.9	72	2
10	54	41	3.8	73	3
20	30	67	u. d. N.	100	6

⁺ BZ = Blutzucker

Schließlich wurde noch nachgeprüft, ob die Oxydation der Asparaginsäure oder Milchsäure durch Insulin vermindert wird. Wie die folgende Tabelle 4 zeigt, tritt bei Verwendung dieser Substrate überhaupt keine Hemmung auf. Der Laktat-Versuch wurde zur Kontrolle angesetzt, um nachzuweisen, daß durch die Insulingabe keineswegs eine generelle Oxydationshemmung erzielt wird. Nach diesen Ergebnissen wird spezifisch die l-Aminosäureoxydase von der Insulinwirkung erfaßt, während die von Transaminasen katalysierte Aminosäureoxydation (s. Asparaginsäure) offensichtlich in der Versuchszeit von 20 Min. unbeeinträchtigt bleibt.

Abb.5

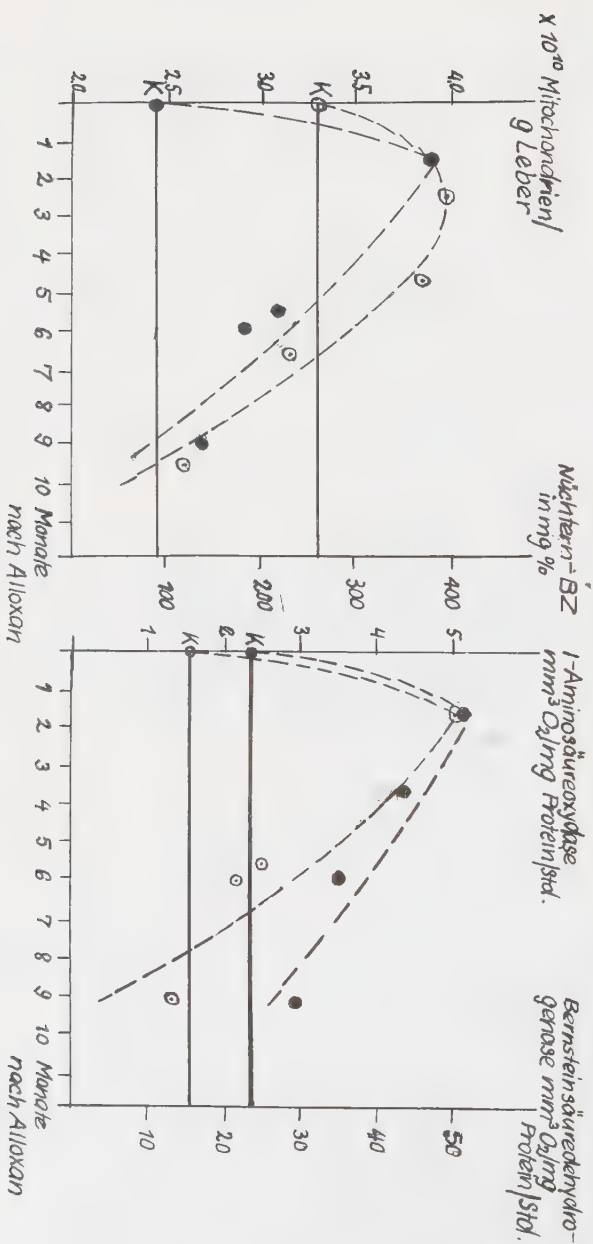


Tabelle 4

Beeinflussung der Oxydation von Milchsäure und Asparaginsäure durch Insulin
(10 E/20 Min.) (Lebermitochondrien)

Blutzucker mg%		THUNBERG nMol TTC/mg Prot./Stunde Laktat; 0.2 ml 0.5 m pro Ansatz	CONWAY µN/mg Prot./Stunde Aspartat; 0.2 ml 0.5 m pro Ansatz
Kontrolle	95	258.9	112.0
Insulin	61	338.1	159.3

In der Abb. 6, Seite 24, ist die Inaktivierung der l-Aminosäureoxydase durch Insulin gemeinsam mit dem Absinken des Blutzuckers graphisch aufgetragen. Man erkennt deutlich, daß die Enzymhemmung der Blutzuckersenkung voraus-eilt, so daß man geneigt sein könnte, an einen Zusammenhang zwischen dem Absinken des Blutzuckers und der Hemmung der l-Aminosäureoxydase zu denken. Verwendet man allerdings für dieselben Versuche Ratten der Auswahl B, die mit "Altromin" gefüttert worden waren, so findet man bei den meisten Tieren über-haupt keine NH_3 -Bildung aus Extra-Alanin. Nur in einzelnen Versuchen waren verhältnismäßig hohe Aktivitäten zu beobachten, die durch Insulin nicht beein-flußt werden konnten, so daß der Verdacht einer Alaninoxidation über Trans-aminasen bestand. Die Blutzuckersenkung durch Insulin wurde nur - allerdings deutlich - verzögert (Tabelle 5).

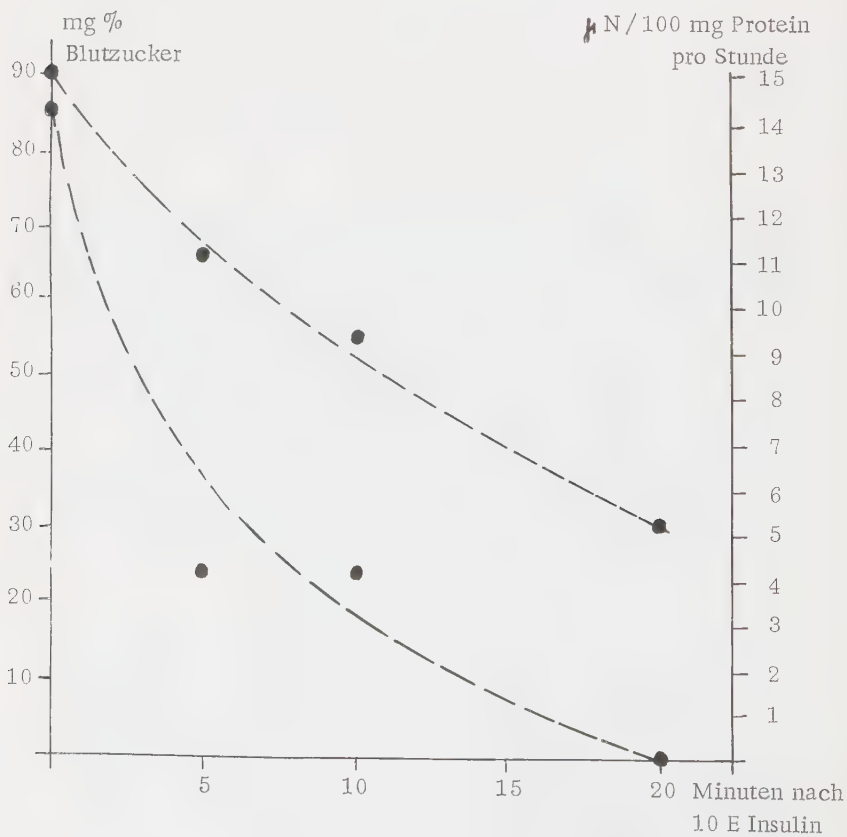
Tabelle 5

Blutzuckersenkung durch Insulin bei verschiedener Fütterung
Nüchternblutzucker nach 10 E Insulin (Mittel aus je 4 Messungen)

Fütterung:	"Altromin"	"Zuchtfutter grün"
0 Minuten	94	91
5 Minuten	82 (70 - 94)	65 (54 - 70)
20 Minuten	54 (43 - 61)	30 (21 - 37)
60 Minuten	30 (24 - 36)	24 (18 - 29)

Abbildung 6

HEMMUNG DER L-AMINOSÄUREOXYDASE
DURCH INSULIN
(CONWAYMETHODE)



Aus zusätzlichen Versuchen, in denen das "Zuchtfutter grün" dem "Altromin" entsprechend mit den Vitaminen A und E angereichert worden war, ging klar hervor, daß diese Vitamine für die Hemmung der l-Aminosäureoxydase in den Lebermitochondrien altromingefütterter Tiere verantwortlich zu machen sind. Um nun ganz sicher zu sein, daß die Zulage dieser Vitamine ein Absinken der l-Aminosäureoxydase-Aktivität auf unmeßbar kleine Werte zur Folge hat, haben wir uns bemüht, die Spezifität des Bestimmungsverfahrens durch Ausschaltung der Transaminasen zu verbessern.

Transaminasen haben als Co-Ferment Pyridoxalphosphat und sind daher durch Hydroxylamin hemmbar (Aldoxim-Bildung). Die Oxydation der Asparaginsäure, die fast ausschließlich über eine Transaminase läuft, wird durch steigende Konzentrationen von Hydroxylamin (NH_2OH) zunehmend gehemmt (Thunberg-Test). Wird in derselben Testanordnung β -Hydroxybutyrat als Substrat verwendet, so bleibt die Formazanbildung auch in Gegenwart von NH_2OH unverändert (Tab. 6). Demnach scheint die Aktivität der Flavinenzyme durch das Hydroxylamin nicht beeinträchtigt zu werden.

Tabelle 6

Hemmung der Transaminierung durch NH_2OH
(Thunberg-Test)

m Konz. an NH_2OH	Substrat:	Aspartat	β -Hydroxybutyrat
		0.2 ml 0.1 m/Ansatz Angaben in n Mol TTC/mg Protein/Stunde	0.2 ml 0.1 m/Ansatz
0		143.2	122.0
10^{-4}		137.2	-
5×10^{-4}		89.3	148.1
10^{-3}		59.4	123.4
2×10^{-3}		9.5	135.9
3×10^{-3}		13.9	-
4×10^{-3}		10.4	-
5×10^{-3}		4.0	-
10^{-2}		0.0	-

Aus der Tabelle 6 geht hervor, daß eine NH_2OH -Konzentration von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Transaminierungsreaktionen praktisch vollkommen unterdrückt. Wir haben daher den Versuchsansätzen sowohl beim Conway- als auch beim Thunberg-Test diese Hydroxylamin-Konzentration zugesetzt und l-Alanin, bzw. l-Leucin als Substrat verwendet. Bei dieser Versuchsanstellung erhielten wir ein eindeutiges Ergebnis, das in der Tabelle 7 wiedergegeben wird: Die gelegentlich hohe NH_3 -Bildung bei den altromingefütterten Ratten wird durch Hydroxylamin vollkommen unterdrückt; andererseits erscheint die Oxydaseaktivität bei Ratten der Auswahl A ("Zuchtfutter grün") auch in Gegenwart von NH_2OH in voller Höhe.

Tabelle 7

Aminosäureoxydation in Gegenwart von NH_2OH (Substrat l-Alanin: 11,25 mg/Ansatz)				
Fütterung:	"ALTROMIN"		"ZUCHTFUTTER GRÜN"	
	CONWAY N/100 mg Prot./Std.	THUNBERG nMol TTC/mg Prot./Std.	CONWAY N/100 mg Prot./Std.	THUNBERG nMol TTC/mg Prot./Std.
NH_2OH	- +	- +	- +	- +
	37,5 u.d.N.	51,6 u.d.N.	15,6 12,1	18,5 16,5
+Insulin (10 E s.c./ 60 Min.)	- -	60,3 -	- -	- -

Andererseits wird durch Insulin nur die Alaninoxidation in den Lebermitochondrien der mit "Zuchtfutter grün" gefütterten Ratten gehemmt (Tab. 8, Seite 27), während die über Transaminasen erfolgende NH_3 -Freisetzung (Altromin-Tiere) überhaupt nicht abnimmt (Tabelle 7). Als bester Test zur Erfassung der l-Aminosäureoxydase-Aktivität kann daher die Bestimmung in Mitochondrien und Sarkosomen mit l-Leucin als Substrat und $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Hydroxylamin im Ansatz empfohlen werden. Aufgrund dieser Versuche können wir sicher aussagen, daß die fettlöslichen Vitamine A und E, in einer dem "Altromin" entsprechenden Konzentration dem "Zuchtfutter" zugesetzt, die l-Aminosäureoxydase-Aktivität unter die Nachweisgrenze senken. Andererseits scheinen bei den Versuchen, die

keinen sicheren Insulin-Effekt auf die Aktivität dieses Enzyms ergeben haben (vgl. S. 4), Transaminase-Aktivitäten wesentlich beteiligt gewesen zu sein,

Tabelle 8

Hemmung der l-Aminosäureoxydase durch Insulin (Thunberg-Test, Substrat l-Leucin = 2,76 mg/Ansatz) Hydroxylamin $2 \times 10^{-3} \text{ m}$	
	nMol TTC/mg Protein/Std.
Kontrolle	10,3
Insulin (10 E/20 Min.)	u. d. N.

Aus den bisherigen Versuchsergebnissen geht klar hervor, daß die l-Aminosäureoxydase für die primäre Blutzuckersenkung allein nicht verantwortlich gemacht werden kann. Auch aus den in der Tabelle 2 (Seite 20) enthaltenen Meßwerten läßt sich entnehmen, daß keine absolute Parallelität zwischen dem Zuckerabfall (in Abhängigkeit von der Zeit nach der Alloxangabe) und der Desaminierungsgeschwindigkeit in den Lebermitochondrien gegeben ist. 9 Monate nach Alloxan ist die Enzymaktivität schon unter die Norm abgesunken, während der Blutzucker noch eindeutig erhöht ist. Wir haben uns daher die Frage vorgelegt, ob bei vollständiger Inaktivierung der l-Aminosäureoxydase vielleicht ein anderes mitochondriales Flavinenzym durch Insulin gehemmt wird und ob bei den "Altromin"-Tieren ein Zusammenhang zwischen der Hemmung dieses Enzyms und der Senkung des Blutzuckers aufzufinden ist.

Eine Hemmung der Bernsteinsäuredehydrogenase konnte von vornherein ausgeschlossen werden, da nach den Untersuchungen von SCHUHMACHER (14) erst 1 Stunde nach s. c. -Gabe von 10 E Insulin eine statistisch nicht gesicherte Abnahme der Aktivität um 8,5 % auftritt. Dagegen findet man schon 15 Minuten nach der Insulinzuführung eine Inhibierung der Butyryldehydrogenase (15) und der DPN-H-Cytochrom C-Reduktase (1), vgl. Abb. 7, Seite 28). Die erste Blutzuckersenkung ist aber schon 5 Min. nach der Insulinverabreichung sicher nachzuweisen und kann daher auch durch die Aktivitätsänderung dieser Enzyme nicht erklärt werden.

STELLUNG DER FLAVINENZYME IM INTERMEDIÄREN STOFFWECHSEL

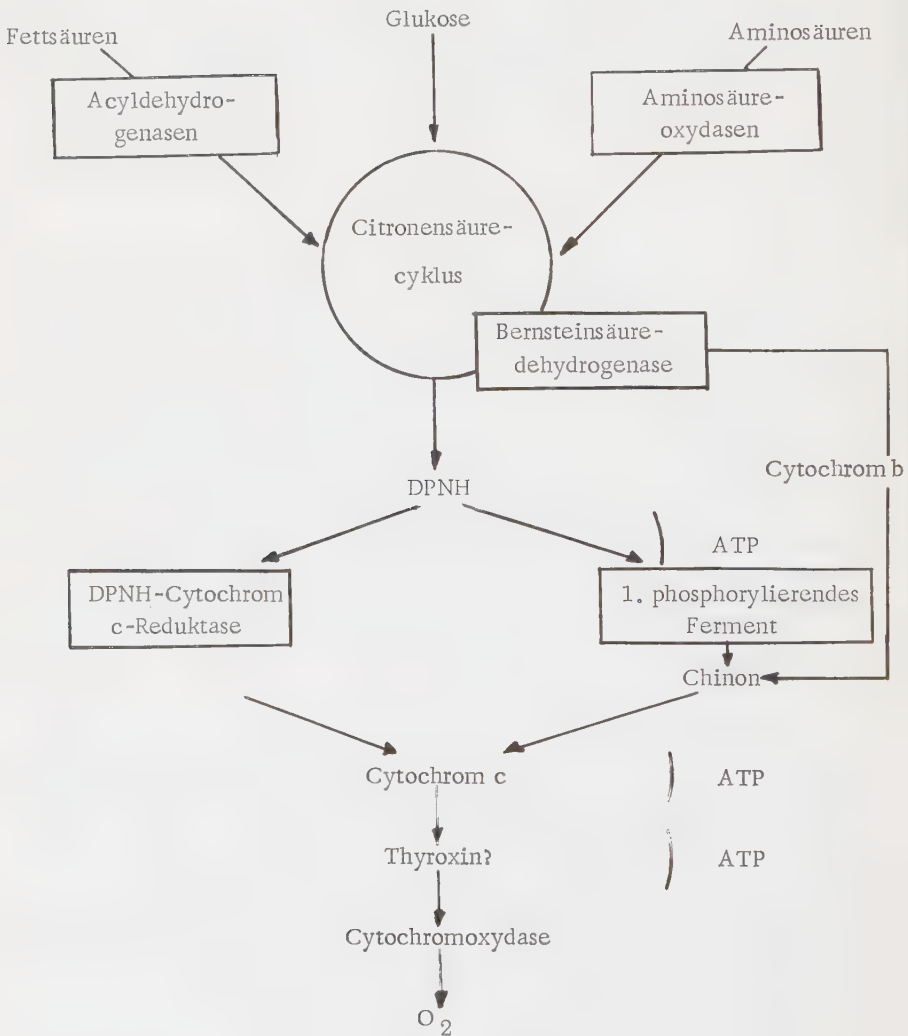


Abbildung 7

Dagegen war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das Flavinenzym der Phosphorylierungskette (vgl. Abb. 7, Seite 28) besonders schnell durch Insulin inhibiert wird. Dieses Enzym ist gegen Hemmstoffe besonders empfindlich, wie sich aus zahlreichen, sogenannten "Entkopplungsreaktionen" ableiten läßt. Als "Entkoppler" werden allgemein Verbindungen bezeichnet, welche die oxydative Phosphorylierung hemmen, ohne die Atmung zu beeinträchtigen. Eine große Anzahl derartiger Entkoppler wirkt vermutlich durch Hemmung des phosphorylierenden Flavinenzyms. LAMPRECHT (12) beobachtete auch in vitro bei Anwesenheit hoher Insulin-Konzentrationen (150-2 000 μ /Ansatz (=1.2 ml)) eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung gewaschener Lebermitochondrien, was für unsere Vermutung spricht, daß man hier in kurzer Zeit einen Effekt des Insulins erwarten könnte.

Die Aktivität dieses Flavinenzyms läßt sich bisher nur über die Phosphorylierungsleistung der Atmungskette, also durch Messung der in der Zeiteinheit von 1 mg Mitochondrien-Protein in ADP eingeführten Menge an anorganischem Phosphat, bestimmen. Als Substrat muß einmal eine DPN-reduzierende Verbindung (z.B. β -Hydroxybutyrat (3Phosphorylierungsstufen, P/O = 3,0)) und in einem zweiten Versuch Bernsteinsäure verwendet werden. Wird das phosphorylierende Enzym inhibiert, so wird die ATP-Ausbeute mit Bernsteinsäure als Substrat nicht verändert, während mit β -Hydroxybutyrat eine Hemmung auftritt. Die Bernsteinsäureoxydation umgeht nämlich die erste Phosphorylierungsstufe und liefert dadurch nur einen maximalen P/O-Quotienten von 2,0, der durch Hemmung der ersten Phosphorylierungsstufe nicht erniedrigt werden kann (vgl. Abb. 7, Seite 28).

Wir haben parallel den Sauerstoffverbrauch und die Phosphorylierungsrate bestimmt und konnten feststellen, daß beide Größen schon 5 Min. nach 10 E Insulin (s. c.) signifikant abnehmen. Auch in diesem Fall eilt die Aktivitätsminderung des Enzyms der Blutzuckersenkung voraus, so daß ein Zusammenhang zwischen beiden Größen denkbar wäre. Daß tatsächlich spezifisch das Flavinenzym gehemmt wird, geht daraus hervor, daß mit Bernsteinsäure als Substrat keine Hemmung auftritt. Alle experimentellen Daten sind in der Tabelle 9 (Seite 30) zusammengestellt. Bei den Tieren der Auswahl A ("Zuchtfutter grün") ist in dem Zeitraum von 5 Min. nach 10 E Insulin keine Beeinflussung der oxydativen Phosphorylierung zu beobachten. Dieser Effekt ist also insbesondere bei den Tieren zu erwarten, deren Futter- dem "Altromin" entsprechend - mit hohen Dosen an fettlöslichen Vitaminen angereichert ist.

Tabelle 9

Beeinflussung der Atmungskettenphosphorylierung durch Insulin
(Altromin-Ratten)
(Mittel aus 4 Messungen)

Minuten nach 10 E Insulin	Nüchtern- Blutzucker mg%	mg-Atome / mg Protein / 25 Minuten		P/O
		P	O	
		a) Substrat: β -Hydroxybutyrat		
0	90	0.73	0.51	<u>1.43</u>
5	72 - 20 %	0.48 - 34 %	0.35 - 31 %	<u>1.40</u>
10	58 - 35 %	0.47 - 36 %	0.31 - 39 %	<u>1.53</u>
20	43 - 52 %	0.53 - 27 %	0.30 - 41 %	<u>1.75</u>
		b) Substrat: Bernsteinsäure		
0	-	0.69	0.74	<u>0.94</u>
10	-	0.67	0.68	<u>0.99</u>

V. DISKUSSION

Die oben beschriebenen experimentellen Untersuchungen haben ergeben, daß unterschiedliche Fütterung, und zwar die Verabreichung unterschiedlicher Mengen an fettlöslichen Vitaminen, die Reaktion des Rattenorganismus auf Insulin verändert. Tiere, denen die fettlöslichen Vitamine A und E nur in dem Umfang zugeführt werden, der Vitaminmangelschäden ausschließt ("Zuchtfutter grün"), haben in der Leber eine verhältnismäßig hohe 1-Aminosäureoxydase-Aktivität, die durch 10 E Insulin (s.c.) innerhalb von 20 Minuten auf unmeßbar kleine Werte gesenkt wird. Parallel mit der Enzymhemmung sinkt der Blutzuckerspiegel. Erhalten die Ratten dasselbe Futter, angereichert mit 10 000 E Vitamin A und 25 mg Vitamin E pro kg, so sinkt die Desaminierungsaktivität der Leber bis an die Grenze der Nachweisbarkeit ab, so daß eine weitere Aktivitätsminderung durch Insulin höchstwahrscheinlich nicht mehr erfolgen kann. Bei diesen Tieren ist die Blutzuckersenkung nach 10 E Insulin verzögert. Parallel mit dem Absinken des Blutzuckers beobachtet man hier eine Hemmung der Phosphorylierungskette, die durch Inhibierung der ersten Stufe, also des Flavinenzyms, zu erklären ist. Als gemeinsames Ergebnis läßt sich registrieren, daß in jedem Fall der Blutzuckersenkung die Hemmung eines Flavinenzyms vorausgeht. Es ist daher die Frage zu diskutieren, ob sich das Absinken des Blutzuckers aufgrund einer Aktivitätsminderung mitochondrialer Flavinenzyme der Leber erklären läßt. Ohne auf die verschiedenen Theorien einzugehen, die heute zur Erklärung der Wirkungsweise des Insulins diskutiert werden, seien zu dieser Frage einige Bemerkungen erlaubt:

Der komplexe Prozeß der Blutzuckersenkung beruht auf zwei Grundphänomenen: 1. der Verminderung der Zuckerabgabe durch die Leber und 2. der Förderung des Zuckerumsatzes in der Leber und der Peripherie (im wesentlichen der Muskulatur). Beide Erscheinungen lassen sich sicherlich auf eine Grundreaktion zurückführen, die das Insulin im intermediären Stoffwechsel erfüllt.

Die Hemmung der Zuckerabgabe wird für die Ratten der Auswahl A ("Zuchtfutter grün") durch die Verminderung des Aminosäuren- und Fettsäurenabbaus (Hemmung der Butyryldehydrogenase (15)) hinreichend erklärt. Die Zuckerbildung erfolgt ja nicht nur aus der Glykogenreserve, sondern primär direkt aus der Glukoneogenese (Zuckerneubildung aus Amino- und Fettsäuren). Beim "Altromin"-Tier entfällt die Hemmung der Zuckerbildung aus Aminosäuren,

Die Senkung des Blutzuckerspiegels erfolgt zwar langsamer, dürfte aber anfangs nur auf einer Beschleunigung des Zuckerumsatzes beruhen, da die Verminderung des Fettsäureabbaus frühestens 15 Minuten nach der Insulingabe zu erwarten ist. Aber warum sollte die Glykolyse intensiviert werden, wenn das Flavinenzym der Phosphorylierungskette oder ein anderes Flavinenzym gehemmt wird?

Die erste Alternative wird nach LYNEN in plausibler Weise verständlich. Auf dem Wege des Zuckerabbaus gebildetes Hexosediphosphat wird in zwei Moleküle Triosephosphat gespalten, die anschließend unter gleichzeitiger Aufnahme von anorganischem Phosphat zu Diphosphoglycerinsäure dehydriert werden. Nach der Auffassung von LYNEN (16;17) wird nun durch die kontinuierliche oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien so viel anorganisches Phosphat gebunden, daß dieses die Geschwindigkeit der im cytoplasmatischen Raum ablaufenden Triosephosphatdehydrierung begrenzt. In dieser Art kann man eine Steuerung der Glykolysegeschwindigkeit durch die phosphorylierende Atmung verstehen, die schon bei Einzellern von großer Bedeutung ist ("Pasteureffekt"). Für unseren Fall könnte man entsprechend annehmen, daß durch die Verminderung der Phosphorylierungsquote mehr anorganisches Phosphat für die Glykolyse verfügbar ist, was einer Steigerung des Zuckerumsatzes gleichkommen würde.

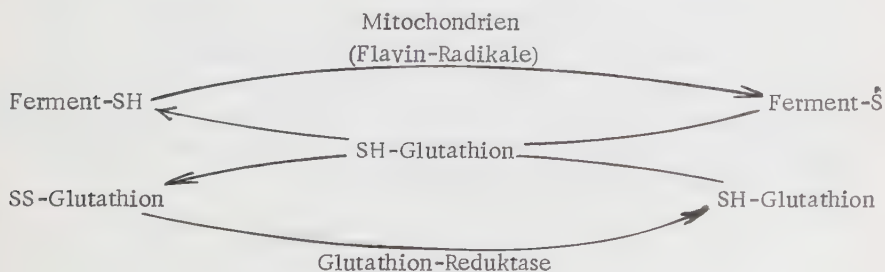
Die mit den Tieren der Auswahl A erhaltenen Ergebnisse sprechen allerdings gegen diese Annahme, es sei denn, daß man die verhältnismäßig schnelle Blutzuckersenkung, die wir hier beobachten konnten, nur durch eine Hemmung der Glukoneogenese erklären will, was wenig wahrscheinlich sein dürfte. Bei diesen Versuchen war die oxydative Desaminierung 5 Minuten nach der Insulininjektion gehemmt, nicht dagegen die oxydative ATP-Synthese. Demnach scheint weniger die Atmungskettenphosphorylierung als vielmehr ganz allgemein die Flavinenzym-Aktivität der Zellmitochondrien die Glykolysegeschwindigkeit zu steuern.

In einer ausführlichen Studie mit großen Tierzahlen konnte LAMPRECHT (18) an der Ratte zeigen, daß die Triosephosphatdehydrierung in der diabetischen Leber gehemmt sein muß, obgleich die im Homogenat getestete Enzymaktivität normal zu sein scheint. Die Hemmung läßt sich aus den Veränderungen der stationären Zwischenstoffkonzentrationen der Glykolyse ableiten: Das Hexosediphosphat und die Triosephosphate sind in der diabetischen Leber stark erhöht ("Triosephosphat-Stau"), das Reaktionsprodukt Brenztraubensäure ist dagegen entsprechend vermindert. Durch Insulin (5 E s. c.) werden die Verhältnisse in 15 Min.

normalisiert. Von besonderem Interesse ist die schon erwähnte Tatsache, daß die Fermentaktivität - gemessen im Homogenat - nicht verändert ist. Wir sind dieser Frage nachgegangen und kamen zu folgender Erklärung dieses Phänomens:

Bei der Reduktion (bzw. Oxydation) des Flavin-Co-Fermentes wird eine radikalartige Zwischenstufe durchlaufen ("Flavinsemichinon"), die sehr reaktionsfähig ist. Macht man jetzt die zweifellos sehr naheliegende Annahme, daß ein wesentlicher Teil der Flavinenzyme in der Mitochondrienmembran angeordnet ist, deren Radikalelektronen sich also faktisch an der Mitochondrienoberfläche anordnen, so werden die Substrat oxydierenden Partikel zu einem Oxydationsmittel, dessen Oxydationsintensität von der Flavinenzymaktivität abhängig ist. Es ist einleuchtend, daß inaktive Flavinfermente keine Radikale bilden können.

Im Cytoplasma sind die SH-Gruppen der Gärungsenzyme oxydationsempfindlich, in erster Linie diejenigen der Triosephosphatdehydrase (19; 20). In diesem Institut durchgeführte Versuche haben nun in der Tat ergeben, daß gerade die Aktivität kristallisierter Triosephosphatdehydrase in Gegenwart intakter Lebermitochondrien augenblicklich geändert wird, und zwar nimmt die Fermentaktivität bei Anwesenheit von 1 - 2 mg Mitochondrienprotein pro ml maximal zu (=200 %), um ab 10 mg/ml unter den Ausgangswert abzusinken. Durch Zusatz von SH-Glutathion (10^{-3} m Endkonzentration) werden diese Effekte aufgehoben, was dafür spricht, daß die Mitochondrien die Triosephosphatdehydrase-Aktivität durch Änderung der SH-Gruppenzahl des Apo-Fermentes beeinflussen. Daß die Fermentaktivität von dem Verhältnis -SH/ $\dot{S}$ (bzw. -S-S-) im Apo-Ferment abhängig ist, konnte LAMPRECHT auf polarographischem Wege nachweisen (21). Demnach dürfte in den Zellen der folgende Kreisprozeß ablaufen, der insbesondere für die Triosephosphatdehydrase gilt und der gleichzeitig die Bedeutung des SH-Glutathions für den Zellstoffwechsel demonstriert:



Das SH-Glutathion würde also die SH-Enzyme des cytoplasmatischen Raumes vor der oxydierenden Wirkung der Mitochondrien schützen. Sind die Mitochondrien sehr aktiv, bzw. in besonders großer Zahl in der Zelle enthalten (z.B. diabetische Leber), wird die Gärung - insbesondere über die sehr empfindliche Triosephosphatstufe - gehemmt ("Triosephosphatstau"). Insulin hemmt die Flavinenzyme und aktiviert damit indirekt die Gärungsfermente. Die Messung der Enzymaktivität ist mit einer außerordentlich großen Verdünnung der Mitochondrien verbunden. Dadurch verschiebt sich der oben diskutierte stationäre Zustand offenbar sehr schnell zugunsten der Reduktion des Glutathions und der Ferment-SH-Gruppen, so daß eine normale Fermentaktivität gemessen wird.

Nach diesen Überlegungen wäre zu folgern, daß SH-Glutathion selbst den Zuckerkernumsatz beschleunigt. Das ist in der Tat der Fall, wie in diesem Institut *in vivo* und *in vitro* am Muskel gezeigt werden konnte (14; 22). Ebenso läßt sich die "Pasteurreaktion" bei Hefezellen durch Zusatz von SH-Glutathion aufheben (23; 24). Wir stellen also fest, daß man auf diesem Wege die Steigerung des Zuckerkernumsatzes nach Insulin direkt mit derjenigen vergleichen kann, die man bei der Hefezelle nach dem Übergang vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel vorfindet; In beiden Fällen werden die Flavinenzyme der Mitochondrien in ihrer Aktivität eingeschränkt, im ersten Fall durch das Insulin, im zweiten Fall durch die Anaerobiose (vollkommen durchreduzierte Atmungskette, keine Möglichkeit zur Ausbildung von Flavinradikalen). Man kommt so zu dem äusserst befriedigenden Ergebnis, daß die Hormone in ihrer Wirkungsweise anscheinend direkt an die primitiven Regulationsmechanismen der Einzeller anschließen. Andererseits wird durch diese Überlegungen die Theorie der Phosphatverschiebung (LYNEN) allgemein erweitert, da die Aktivitätsänderung des phosphorylierenden Flavinenzyms an sich schon die hemmende Wirkung der Mitochondrien auf oxydationsempfindliche Gärungsenzyme vermindert.

Auch die bisher aufgestellten Theorien, nach denen die Steigerung des Zuckerkernumsatzes durch Insulin auf einer Begünstigung der Hexokinase-reaktion, bzw. auf einer Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran beruht, lassen sich unter dem übergeordneten Gesichtspunkt "Änderung der Aktivität mitochondrialer Flavinenzyme" diskutieren. Auf eine ausführliche Diskussion dieser Problematik muß allerdings an dieser Stelle verzichtet werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Beeinflussung der 1-Aminosäureoxydase-Aktivität der Rattenleber durch das Hormon Insulin mit drei verschiedenen Methoden untersucht: Dem Thimbergtest (Messung der Formazanbildung aus Triphenyltetrazoliumchlorid), der Warburgmethode (manometrische Erfassung des O_2 -Verbrauches) und dem Conwayverfahren (Messung der NH_3 -Freisetzung).

Bei Ratten, die mit einer institutseigenen Zuchtdiät gefüttert wurden, konnte mit allen drei Methoden eindeutig eine Hemmung der Fermentaktivität durch Insulin nachgewiesen werden. Innerhalb von 20 Minuten nach s.c. Verabfolgung des Hormons (10 E) war die Aktivität in jedem Falle auf unmeßbar kleine Werte abgesunken. Dabei eilt die Hemmung der Aminosäureoxydation der Blutzuckersenkung voraus. Im Alloxandiabetes fand sich andererseits eine Steigerung der 1-Aminosäureoxydase-Aktivität auf das 3- bis 4-fache.

Wurde die Zuchtdiät mit den fettlöslichen Vitaminen A und E (10 000 E, bzw. 25 mg/kg Futter) angereichert, so war keine 1-Aminosäureoxydase mehr in der Leber nachweisbar. Bei einzelnen Tieren mit Alanin als Substrat beobachtete, verhältnismäßig hohe Oxydationsquoten waren durch Transaminasen bedingt, wie durch Zusatz von Hydroxylamin ($2 \times 10^{-3} M$) zum Ansatz bewiesen werden konnte. Bei derartig gefütterten Ratten wird das Flavinenzym der Phosphorylierungskette sehr schnell durch Insulin gehemmt (5 Minuten nach 10 E des Hormons um 30%). Zwischen diesem Hemmeffekt und der Blutzuckersenkung besteht ebenfalls eine deutliche Korrelation.

Abschließend wird festgestellt, daß in beiden Fällen - unabhängig von der Art des Futters - der Blutzuckersenkung die Hemmung eines Flavinenzyms vorausgeht. Die mögliche Bedeutung dieses Befundes für die Wirkungsweise des Insulins wird diskutiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. SCHOLE, J.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 323, 1 (1961)
2. SCHOLE, J.
9. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der
Haustiere, Stuttgart-Hohenheim (1959)
3. SCHOLE, J., HIEBER, K.
Vitamine und Hormone 8, 78 (1958)
4. SCHOLE, J.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 317, 281 (1959)
5. FRIEDEN, C., VELICK, S.F.
Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 23, 439 (1957)
6. BLANCHARD, M., GREEN, D.E.,
NOCITO, V., RATNER, S.
J. Biol. Chem. 155, 421 (1944)
161, 583 (1945)
7. BOULANGER, P., COURSAGE, J.,
BERTRAND, J., OSTEUX, R.
C.r. Acad. Sci. (Paris) 244, 2255 (1957)
8. SHEFFNER, L., BERGEIM, O.
J. Nutr. 50, 141 (1953)
9. CAGAN, R. N., GRAY, J.L., JENSEN, H.
J. Biol. Chem. 183, 11 (1950)
10. BACH, S.J., HOLMES, E. G.
Biochem. J. 31, 89 (1937)
11. STADIE, W.C., LUKENS, F.D.W., ZAPP, J.A., Jr.
J. Biol. Chem. 132, 393 (1940)

12. LAMPRECHT, G.
Dissertation T.H. München 1956
13. SCHOLE, J.
unveröffentlichte Versuche
14. SCHUMACHER, R.
Dissertation München 1958
15. WOLF, F.
Dissertation München, in Vorbereitung
16. LYNEN, F.
Liebigs Ann. 546, 120 (1941)
17. LYNEN, F.
Proc. of Intern. Sympos. of Enzym Chem. Tokyo and Kyoto (1957)
18. LAMPRECHT, W., TRAUTSCHOLD, I.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 311, 245 (1958)
19. HOLZER, H., HOLZER, E., SCHULTZ, G.
Biochem. Zeitschr. 326, 385 (1955)
20. WEITZEL, G., SCHAEG, W.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 316, 250 (1959)
21. LAMPRECHT, W.
persönliche Mitteilung
22. SCHOLE, J., KARG, H., GENEWEIN, R.
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 308, 91 (1957)
23. QUARTEL, J.H., WHEATLEY, A.H.M.
Biochem. J. 26, 2169 (1932)
24. SCHOLE, J.
unveröffentlichte Versuche

Zum Abschluß der Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Dr. Johs. Brüggemann für die Überlassung des Themas und für die großzügig gewährten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Ferner gebührt mein Dank Herrn Dr. Schole, der mich bei der Durchführung der Versuche und bei der Abfassung der Arbeit beraten hat.

LEBENS LAUF

Am 31. August 1937 wurde ich als Sohn des Oberförsters Otto Weik und seiner Ehefrau Erika, geb. Müller, in Schwäbisch Hall geboren.

Ab Herbst 1943 besuchte ich die Volksschule in Ochsenberg, Kreis Heidenheim/Brenz. Im Herbst 1948 trat ich in die Hellenstein-Oberschule in Heidenheim ein.

Nach dem Umzug meiner Eltern nach Herrenberg besuchte ich ab Herbst 1951 das Herrenberger Progymnasium und ab Frühjahr 1954 das Goldberg-Gymnasium in Böblingen-Sindelfingen, wo ich im Frühjahr 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1. April 1957 bis 31. März 1958 leistete ich in Amberg/Opf. als Wehrpflichtiger meinen Wehrdienst ab.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin. Nach neunsemestrigem Studium in München legte ich im Frühjahr 1963 das Tierärztliche Staatsexamen ab.

